

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Evaluación del rearrreglo de citoesqueleto en queratinocitos humanos infectados con actinomicetos

Pertenece al proyecto genérico:

Evaluación de productos relacionados con la salud

Alumna: Sánchez Torres María Marcela

Matricula: 2143061001

Lugar de realización: UAM-X, Laboratorio de Inmunología, UIDIS

Fecha de inicio: 24 de septiembre de 2018

Fecha de término: 22 de noviembre de 2019

Asesores:

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

M. en C. Alfonso Santiago Téllez

Noviembre, 2019

Índice

	Pág.
1. Introducción	2
2. Marco Teórico	3
2.1 Actinomicetoma	3
2.2 Distribución geográfica	4
2.3 Agentes etiológicos	4
2.4 Inmunidad innata y adaptativa de la piel	7
2.5 El papel del citoesqueleto en la respuesta inmune	9
3. Objetivos	10
3.1 Objetivo general	10
3.2 Objetivos específicos	10
4. Métodos	10
4.1 Cepas bacterianas	10
4.2 Cultivo celular	11
4.3 Infección celular	11
4.4 Fijación de muestras	11
4.5 Tinción de citoesqueleto	12
4.6 Visualización de las muestras	12
5. Resultados	12
6. Discusión	17
7. Conclusión	20
8. Referencias	20

1. Introducción

El actinomicetoma es una infección crónica granulomatosa de la piel causada por un grupo de bacterias denominadas actinomicetos, de los cuales la especie *Nocardia brasiliensis* es la que se aísla en el mayor número de casos en el mundo (Verma & Jha, 2019; Welsh, 2018). En México además de los casos reportados con *N. brasiliensis* como agente causal, también hay casos reportados con aislamiento de *Actinomadura madurae* (López-Martínez et al., 2013). Esta enfermedad de la piel ha sido poco estudiada y la mayoría de los informes sobre la patogénesis de la infección están enfocados en macrófagos y neutrófilos, sin embargo los queratinocitos parecen ser una estirpe celular que a pesar de no ser clasificada como parte de la respuesta inmune profesional, su papel en la ayuda del control de los procesos infecciosos comienza a reconocerse (Simanski, Erkens, Rademacher, & Harder, 2019; Erdei et al., 2018; Kim, Seong, Son, & Shin, 2019).

Se sabe que los queratinocitos de la piel sobre expresan receptores como los Toll, NOD, “scavenger” entre otros (Morizane, Kajita, Mizuno, Takiguchi, & Iwatsuki, 2019; López-González et al., 2018), además producen moléculas de la respuesta innata como quimiocinas, citocinas pro y antiinflamatorias y péptidos antimicrobianos (Simanski et al., 2019; Woon-Hae et al., 2018). Recientemente se ha demostrado que también producen especies reactivas del oxígeno (ROS) (Barygina et al., 2019) y óxido nítrico (NO) (Dias et al., 2017), como mecanismos para la eliminación de patógenos y el eventual control de los procesos infecciosos.

Estos mecanismos de control de las infecciones también depende de las fibras que componen el citoesqueleto, por ejemplo se sabe que el citoesqueleto tiene un papel fundamental en los procesos de producción de ROS y NO (Kollau et al., 2018; Karki et al., 2019). Además gran parte de los mecanismos de transporte, tráfico y división celular de las células eucariotas son mediados por el citoesqueleto, el cual es una red de fibras que tiene entre otras funciones mantener la ultraestructura celular. Las dos proteínas con mayor abundancia que forman parte del citoesqueleto son la actina y la tubulina, recientemente se han

identificado otras proteínas que también forman parte de esta compleja estructura (Pelaseyed & Bretscher, 2018). En el caso de las infecciones, se ha demostrado que una vez que se da la interacción del patógeno con las células hospedadas, estas activan mecánicas transmisiones donde el citoesqueleto tiene una relevante función después de estas señales mecánicas se inducen múltiples mecanismos dentro de los más estudiados destacan los de interiorización de bacterias al citoplasma, ya sea dentro de vacuolas o libres de ellas (García-Pérez et al., 2012). Una vez dentro, los mecanismos de eliminación bacteriana también dependen de las fibras del citoesqueleto, por ejemplo en la fusión del fagosoma con el lisosoma, la participación de las fibras de actina y tubulina son muy relevantes (Kollau et al., 2018).

Respecto a la patogénesis de la infección por actinomicetos en células de la piel se sabe muy poco incluyendo la existencia de un rearrreglo de actina como consecuencia de la infección por *Nocardia* y *Actinomyces* por lo que este proyecto tiene por objetivo evaluar dicho fenómeno.

2. Marco teórico

2.1 Actinomicetoma

El micetoma es una infección granulomatosa crónica de la piel y el tejido subcutáneo, que puede ser clasificado según su agente causal en eumicetoma (hongos) y actinomicetoma (bacterias). El micetoma bacteriano representa el 60% de los casos en todo el mundo (Verma & Jha, 2019), mientras que en México representa el 96.52% (Méndez, 2014).

El actinomicetoma es causado por bacterias saprofitas del suelo y de algunas plantas (Relhan, Mahajan, Agarwal, & Garg, 2017), los patógenos más frecuentes son *Streptomyces somaliensis*, *Actinomyces madurae*, *A. pelletieri*, *Nocardia brasiliensis* y *N. asteroides* (Emmanuel, Dumre, Stephen, Karbwang, & Hirayama, 2018), el organismo generalmente se implanta después de una lesión traumática mientras se realizan trabajos agrícolas por personas descalzas o a través de abrasiones preexistentes (Relhan et al., 2017), es por esta razón que la mayoría de las lesiones se encuentran en las extremidades inferiores como el pie (80%),

aunque existen otros sitios corporales afectados que incluyen, manos, cuello, pecho, espalda, entre otros (Nenoff, Van de Sande, Fahal, Reinel, & Schöfer, 2015).

El micetoma es una enfermedad endémica de países tropicales y subtropicales, que continúa representando una amenaza para la salud pública (Emmanuel et al., 2018). Esta enfermedad con frecuencia afecta a los habitantes de comunidades rurales (M. Abbas et al., 2018), si este padecimiento no se detecta y trata en etapas tempranas puede provocar la destrucción de tejidos profundos, como músculos, huesos, articulaciones y, tendones, lo que conlleva una alta morbilidad (Nenoff et al., 2015), deformidades en las extremidades, discapacidad severa, terminación prematura de la ocupación, dificultad para encontrar trabajo (M. Abbas et al., 2018) y demás consecuencias socioeconómicas y psicológicas que afectan a los pacientes, sus familias y la sociedad en general (Nenoff et al., 2015). El diagnóstico por lo tanto dependerá de la identificación rápida y precisa del micetoma y la cuidadosa distinción del eumicetoma y el actinomicetoma (Emmanuel et al., 2018).

2.2 Distribución geográfica

El micetoma prevalece en el “cinturón del micetoma” que se extiende entre las latitudes 15° sur y 30° norte del ecuador, incluyendo países como Sudán, Somalia, Senegal, India, Yemen, México, Venezuela, Colombia, Argentina y Brasil (Emmanuel et al., 2018). No obstante, el micetoma también se ha reportado en muchas regiones de Estados Unidos, Francia, Alemania, Reino Unido, Turquía, Egipto, Arabia Saudita, Irán, Tailandia y Japón (Mohamed, Fahal, & Sande, 2015). Además, el actinomicetoma también se encuentra en América Central y del Sur (Van de Sande, 2013).

En México *N. brasiliensis* es el organismo responsable más frecuente para el 86% de todos los casos (Emmanuel et al., 2018). Y en un estudio realizado en 2013 en el que se recopilaron 3993 casos de micetomas, el 96.52% fueron actinomicetomas, y del total de casos 75.6 % correspondieron a pacientes

masculinos, que habitan los estados de Jalisco, Morelos, Nuevo León, Guerrero, Veracruz y Michoacán (Méndez, 2014).

2.3 Agentes etiológicos

Las actinobacterias conforman un phylum cosmopolita, que podemos encontrar en diversos ecosistemas terrestres o acuáticos, el nombre actinomicetos deriva del griego “atkis” (rayo) y “mikes” (hongo), porque anteriormente se consideraba que estas bacterias eran formas de transición entre hongos y bacterias, pero hoy se sabe que pertenecen al reino bacteria (Chaudhary, Soni, Shrivastava, & Shrivastava, 2013).

Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas, filamentosas con un alto contenido de G+C (guanina-citosina) en sus genomas. La mayoría de las actinobacterias son aeróbicas, quimioheterotróficos y pueden utilizar una amplia variedad de fuentes nutricionales, incluidos varios polisacáridos complejos (Barka et al., 2015).

Los actinomicetos tienen micelio radial bien desarrollado, que se puede presentar en dos formas micelio de sustrato y micelio aéreo. El micelio de sustrato crece en el medio o en la superficie del medio de cultivo y su función principal es la absorción de nutrientes, mientras que el micelio aéreo es una hifa que el micelio del sustrato desarrolla y crece en el aire (Li, Chen, Jiang, & Jiang, 2016).

Los actinomicetos producen micro colonias iniciales compuestas de filamentos después de 24 a 48 horas (Chaudhary et al., 2013), son principalmente mesofílicas, con un crecimiento óptimo a entre 25 y 30°C y crecen mejor a un pH entre 6 y 9, con un crecimiento máximo alrededor de la neutralidad (Barka et al., 2015).

El phylum actinobacteria se divide en 6 clases, que son, actinobacterias, acidimicrobiia, coriobacterias, nitriliruptoria, rubrobacterias y termoleofilia. La clase de actinobacterias se divide en 16 órdenes (Chaudhary et al., 2013) de los cuales *N. brasiliensis* y *A. madurae* pertenecen al mismo, el orden de los Actinomycetales (Kroppenstedt & Goodfellow, 2006) a pesar de esto encontramos diferencias muy

marcadas en la compasión de su pared, que es otro parámetro que nos ayuda a diferenciar actinomicetos. La pared bacteriana consiste en una gran variedad de compuestos complejos que incluyen peptidoglucano, ácido teicoico, teicurónico y polisacáridos. El peptidoglucano es un polisacárido compuesto por dos derivados de azúcares, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, y unos pocos aminoácidos, L-alanina, D-alanina, D-ácido glutámico y L-lisina o una molécula de estructura similar, el ácido diaminopimélico (DAP). La presencia o ausencia de isómeros ópticos específicos del aminoácido del ácido 2,6-diaminopimélico (DAP) es otra característica importante de las paredes celulares de las bacterias Gram positivas. El peptidoglucano de las actinobacterias puede contener LL- o DL- (meso) -DAP, dependiendo del género como se muestran en la tabla 1. Al considerar el isomerismo DAP y la presencia o ausencia de otros aminoácidos y amino azúcares, se lograron identificar ocho quimiotipos distintos de la pared celular actinobacteriana.

Tabla 1. Diferentes tipos de componentes de la pared celular en Actinomicetos.

Tipo de pared celular	Constituyentes principales	Género
I	LL -DAP, glicina, sin azúcar	<i>Arachnia</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Pimelobacter</i> , <i>Streptomyces</i>
II	meso- DAP, glicina, arabinosa, xilosa	<i>Actinomyces</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Ampulariella</i> , <i>Catellatosporia</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Glycomyces</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Pili melia</i>
III	meso- DAP, madurosa (3- O- metil-D -galactosa)	<i>Actinocorallia</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Dermatophylus</i> , <i>Frankia</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Kitasatospora</i> , <i>Maduromycetes</i> , <i>Micr obispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Pl anomonospora</i> , <i>Planotetraspora</i> , algunos <i>Frankia</i> spp., <i>Spirillospora</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>T hermoactinomyces</i> , <i>Thermomonospora</i>
IV	meso- DAP, arabinosa, galactosa	<i>Micropolisopra</i> , <i>Nocardioformas</i>
V	Privado de DAP; posee lisina y ornitina	<i>Actinomyces</i>
VI	Privado de DAP; presencia variable de ácido aspártico, galactosa	<i>Arcanobacterium</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Oerskov ia</i> , <i>Promicromonospora</i>
VII	Privado de DAP; ácido diaminobutírico, glicina, con lisina variable	<i>Agromyces</i> , <i>Clavibacter</i>
VIII	Privado de DAP; ornitina	<i>Aureobacterium</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Cellulomonas</i>

La tabla indica los diferentes tipos de componentes de pared celular de las actinobacterias y la clasificación de esta. *Actinomadura* y *Nocardia* tienen diferente tipo de pared celular según esta clasificación.

Los actinomicetos también se pueden agrupar en cinco grupos de acuerdo a los azúcares de diagnóstico presentes en su pared: el grupo A comprende aquellas especies cuyas paredes celulares contienen arabinosa y galactosa; las paredes celulares del grupo B contienen madurosa (3-O-metil-d-galactosa); el grupo C consiste en aquellos sin azúcares de diagnóstico; las paredes celulares del grupo D contienen arabinosa y xilosa; las paredes celulares del grupo E contienen galactosa y ramnosa, ubicando a *N. brasiliensis* y *A. madurae* en el grupo D (Barka et al., 2015).

2.4 Inmunidad innata y adaptativa de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y por lo tanto del sistema inmunitario. Los componentes de la inmunidad adaptativa de la piel son una serie de mecanismos antígeno-específicos realizados por varios componentes celulares de la epidermis y la dermis, también utilizados por el sistema inmunitario en otros órganos y sistemas y cuyas características clave son la especificidad y la memoria (Navarrete, 2007; Torres, Vásquez del Mercado, Moreno, & Arenas, 2008). La inmunidad innata, también conocida como natural, es la protección con la que nacemos, se considera la primera línea de defensa y está compuesta por células que reaccionan inespecíficamente contra ciertos agresores, e incluye barreras naturales como la piel y las mucosas. Este tipo de respuestas carece de memoria inmunológica y entre las células de la epidermis (queratinocitos, de Langerhans, melanocitos, linfocitos T y NK) existen sistemas de reconocimiento para los microorganismos que pueden activarse para producir mecanismos para el control de agentes infecciosos, como los factores de complemento de las vías clásica y alterna, los péptidos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas e histatinas), las citocinas, las quimiocinas y las especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico (NO) (Navarrete, 2007; Torres et al., 2008; López Martínez et al., 2013). Cuando los microorganismos penetran, son reconocidos por sensores microbianos, un

conjunto de receptores de reconocimiento de patrón expresados en la superficie y en compartimentos intracelulares de muchos tipos de células, incluyendo macrófagos y células dendríticas. Los receptores de reconocimiento de patrones, que incluyen los receptores tipo Toll (TLR), identifican un amplio tipo de infecciones mediante el reconocimiento de unas pocas estructuras bioquímicas distintivas, altamente conservadas presente en muchos microorganismos, tales como lipopolisacáridos (Rivas-Santiago, Sada, Hernández-Pando, & Tsutsumi, 2006).

La piel está constituida por tres capas superpuestas, que de la superficie a la profundidad son: 1) la epidermis; 2) la dermis; y, 3) la hipodermis o tejido graso subcutáneo. La epidermis, como epitelio de superficie, es un epitelio plano poliestratificado queratinizado con cuatro capas, las diferentes capas en realidad constituyen en realidad los diferentes estadios en la maduración de los queratinocitos (Castañeda-Casimiro et al., 2009). La epidermis está constituida en aproximadamente un 90% por las células epidérmicas (queratinocitos). En la epidermis también se encuentran presentes las células de Langerhans, justo por encima de la capa basal de queratinocitos. Estas células expresan receptores HLA-A y producen citocinas como la IL-2; se les atribuye una función de vigilancia inmune en la piel y en la mediación de la respuesta inmunitaria (Rivera, Palma Ramos, & Padilla Desgarenes, 2007; Sánchez-Ramón, López-Longo, & Carreño, 2011; Rojas-Espinosa, 2006). Los linfocitos se observan en poca cantidad, y son principalmente linfocitos T (CD4 y CD8). Además, se encuentran melanocitos (sistema pigmentario) y células de Merkel (sistema nervioso). Entre Las funciones protectoras de la piel se encuentran: defensa ante las infecciones por virus, bacterias u hongos: La película superficial cutánea tiene un efecto antimicrobiano. Cuando se produce una herida, se desencadena una reacción defensiva de la piel en forma de inflamación local (Mesa & Patino, 2006; A. K. Abbas, Lichtman, & Pillai, 2008; Parham, 2011).

Los queratinocitos intervienen activamente en la formación de una barrera mecánica, fisicoquímica e inmunológica. Elaboran queratinas y otras proteínas no

estructuradas, las que intervienen en el proceso de queratinización de los epitelios, con y sin estrato córneo. Durante la cito-diferenciación adicionan nuevas queratinas, cuyo peso molecular aumenta a medida que las células migran hacia la superficie. Los queratinocitos también participan en el proceso inmunológico local, intervienen en la maduración post-tímica e instrucción de algunos linfocitos, inducen a las células T inmaduras a sintetizar la enzima TdT, producen sustancias parecidas a las hormonas y excretan interleucina-1 (Kindt, Goldsby, & Osborne, 2007). Por otro lado, la cohesión de las células epidérmicas se debe a la presencia de una sustancia de cemento intercelular (glucocalix) constituida por glucoproteínas. Los queratinocitos producen queratina, pero además sintetizan otras sustancias químicas, como: alfa interferón, prostaglandinas, factores estimulantes de colonias granulocíticas-monocíticas, factor activador de los timocitos, derivado de las células epidérmicas (ETAf) (Marriott, Hellewell, Whyte, & Dockrell, 2007). Son muchos los papeles de los queratinocitos en la respuesta inmunitaria contra las infecciones. Los patrones moleculares asociados con patógenos de microorganismos inducen la producción en este tejido de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β quimiocinas IL-8/CXCL8), y péptidos antimicrobianos (hBD-2), por la activación de los receptores tipo Toll en queratinocitos. Los péptidos antimicrobianos derivados de los queratinocitos eliminan los patógenos y previenen la diseminación de infecciones sistémicas. Las citocinas derivadas de los queratinocitos (TNF- α) y quimiocinas (IL- 8/CXCL8) median el reclutamiento de células inmunes efectoras (neutrófilos) a los sitios de infección, aumentan la extravasación y forman un gradiente químico en la dermis (García-Pérez et al., 2011).

2.5 El papel del citoesqueleto en la respuesta inmune

Por otro lado el citoesqueleto es una estructura dinámica y adaptativa cuyos componentes y proteínas reguladoras están en constante flujo.

El citoesqueleto se conforma por tres polímeros principalmente, que son los filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios (Fletcher & Mullins, 2010). Dentro de las funciones principales del citoesqueleto encontramos: (i)

organiza espacialmente del contenido celular, manteniendo la estructura local y global de la célula y facilitando el transporte intracelular; (ii) conecta a la célula con su entorno externo (interacción célula-célula o con la matriz extracelular), brinda estabilidad mecánicamente a la membrana plasmática, y (iii) generar fuerzas coordinadas que permitan cambios de forma y movimientos (Gefen & Weihs, 2016). Dentro de los componentes del citoesqueleto los filamentos de actina cobran cierta importancia debido a su participación en diversos eventos inmunológicos como son: a) soportan protuberancias filopodiales, que están involucradas en la quimiotaxis, b) generan fuerzas involucradas en los cambios en la forma celular, como los que ocurren durante la fagocitosis, c) el ensamblaje de haces contráctiles de filamentos de actina (fibras de estrés) cuando las integrinas se unen a sus ligandos y d) en etapas finales de la endocitosis, las señales de la membrana plasmática invasora despolimerizan los filamentos de actina para ensamblarse localmente, ayudando a esta región de la membrana a internalizarse como una vesícula endocítica (Fletcher & Mullins, 2010; Svitkina, 2018).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Evaluar el rearrreglo de citoesqueleto en queratinocitos humanos infectados con actinomicetos.

3.2 Objetivos específicos

- Estandarizar de un modelo de infección de queratinocitos humanos con diferentes cepas de actinomicetos.
- Determinar el rearrreglo de las fibras de actina en queratinocitos humanos infectados con actinomicetos.

4. Métodos

4.1 Cepas bacterianas

En este proyecto se utilizaron las cepas de referencia *Nocardia brasiliensis* ATCC 19296 y *Actinomyces madurae* ATCC 19425 así como un aislado clínico de *A. madurae* el cual proviene de un paciente del Hospital General Dr. Manuel Gea González identificado como Gea, dicho aislado fue tipificado por métodos

microbiológicos y moleculares. Las cepas *N. brasiliensis* y *A. madurae* fueron crecidas en agar BHI (Difco), mientras que el aislado clínico (*A. madurae* Gea) en agar Sabouraud (Difco), en todas las cepas se verificó la pureza por tinción de Gram.

Se realizaron resiembras de todas las cepas en caldo BHI para las cepas *N. brasiliensis* y *A. madurae* y en caldo Sabouraud para *A. madurae* Gea y se dejaron en crecimiento hasta alcanzar la fase logarítmica todas las cepas se ajustaron por método nefelómetro a una concentración de 300×10^6 UFC/mL. Una vez ajustadas, las bacterias fueron teñidas con una solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) por 1 hora en oscuridad, para las cepas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* y 1:30 horas para la *A. madurae* Gea, pasado este tiempo se lavaron al menos tres veces con PBS1X (centrifugándolas a 10000 rpm/5 min).

4.2 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT los cuales provienen de la colección ATCC. Los queratinocitos fueron crecidos en medio RPMI (Thermo Fisher), suplementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de penicilina/estreptomina, los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia de al menos el 80%. Se realizaron cambios de medio cada tercer día.

4.3 Infección celular

Se realizaron monocapas en placas estériles de 12 pozos (a cada pozo se le colocó un cubreobjetos estéril), conteniendo 200000 células, de la suspensión bacteriana se realizaron los cálculos necesarios para ajustar un índice de infección (MOI) de 20:1. En todos los casos se utilizaron células sin infectar como controles. Las células se infectaron por 2 horas, pasado ese tiempo el medio de infección se sustituyó por medio RPMI-amikacina 80µg/mL para eliminar las bacterias extracelulares, pasado este tiempo las monocapas se lavaron tres veces con PBS1X y a partir de ese momento se siguieron tiempos de 2, 6, 24, 48 y 72 horas

post infección. Este paso se llevó a cabo en condiciones de oscuridad debido al marcaje de la bacteria con el fluorocromo.

4.4 Fijación de muestras

Pasado cada tiempo post infección se recuperó el cubreobjetos y se pasó a una nueva placa, las monocapas se lavaron tres veces con PBS1X y posteriormente se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% por 30 min, posteriormente el paraformaldehído fue sustituido por PBS1X y el cubreobjetos se almaceno a 4°C hasta su tinción.

4.5 Tinción de citoesqueleto

Cada monocapa (cubreobjetos) se lavó tres veces con PBS1X posteriormente se tiñó con una solución de Faloidina-Rodaminada (Pha-Rho) (Sigma-Aldrich). Las monocapas se incubaron con el fluorocromo durante 30 min, posteriormente cada laminilla se lavó por al menos tres veces con PBS1X, posteriormente se montaron en portaobjetos limpios, utilizando como medio de montaje VectaSHield-DAPI (VectorLabs), los cubreobjetos se sellaron con barniz y se almacenaron a 4°C hasta su lectura.

4.6 Visualización de las muestras

Una vez terminadas las tinciones el rearreglo del citoesqueleto se evaluó en cada lamilla en un microscopio de epifluorescencia Motic utilizando el programa Motic Image Plus 3.0, utilizando los filtros azul, rojo y verde.

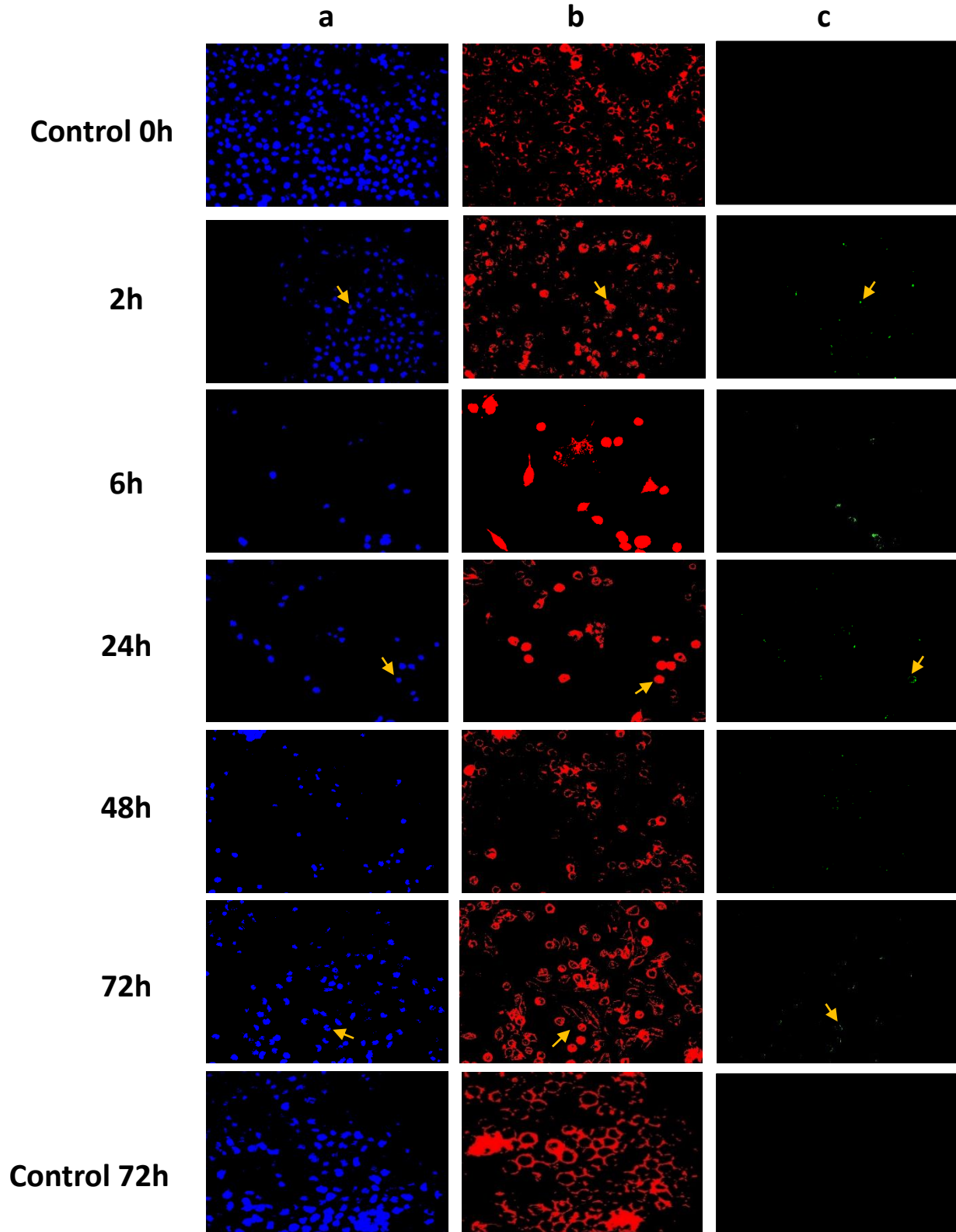
5. Resultados

La tinción con colorantes fluorescentes y el uso de microscopia de epifluorescencia permitió la observación detallada de los queratinocitos infectados como se muestra en las figuras 1, 2 y 3. Se utilizaron dos fluorocromos: DAPI para marcar los núcleos de los queratinocitos en color azul, faloidina-rodaminada para teñir la fibras de actina del citoesqueleto de los queratinocitos en color rojo, esto se realizó dentro de un ensayo de infección celular como se describe en el punto 4.3 y cada tiempo fue teñido como se describe en los métodos 4.5 y las

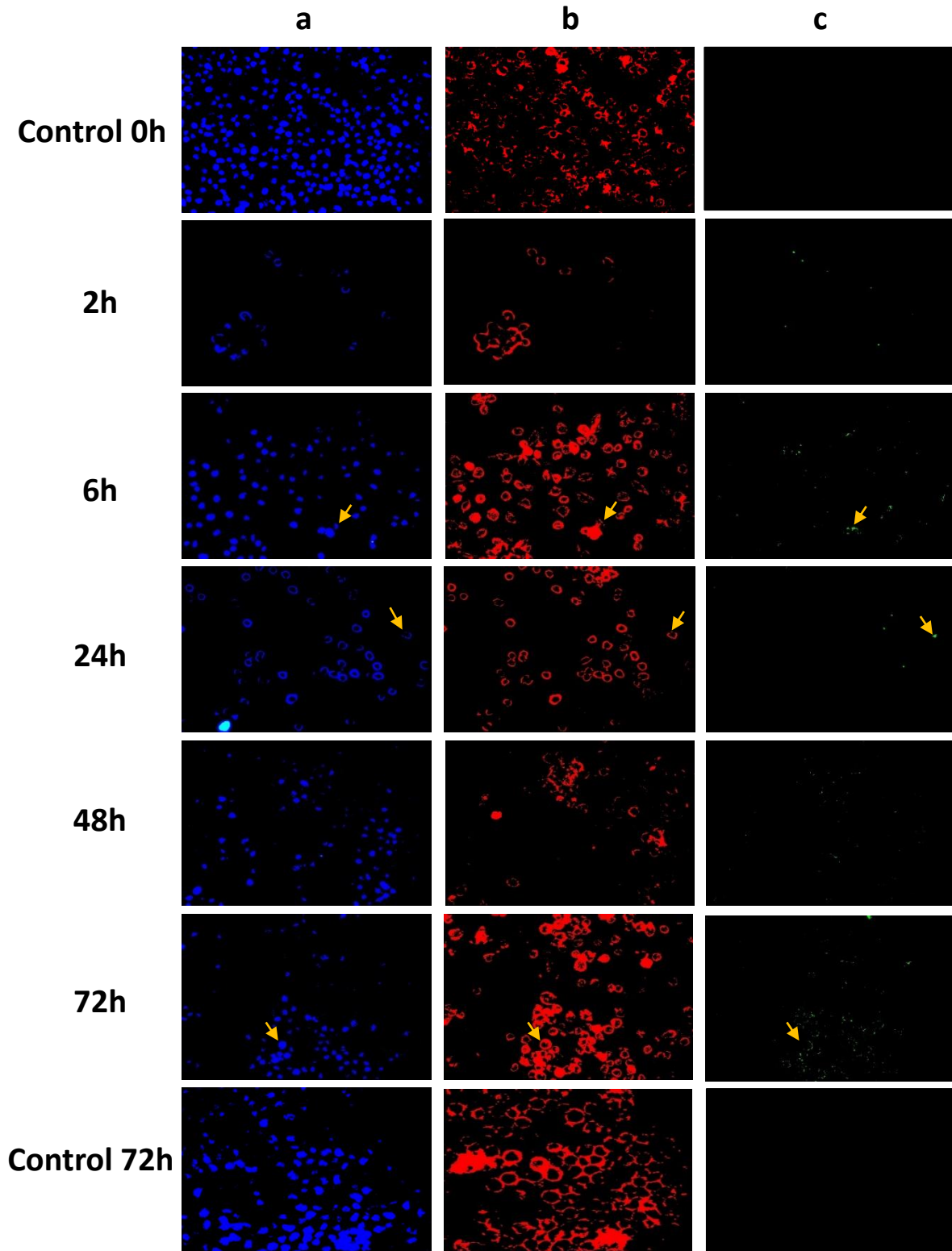
preparaciones fueron observadas en un sistema de escaneo por epifluorescencia Motic Image Plus 3.0.

Las imágenes fueron tomadas con muestras a los diferentes tiempos de infección, y en estas se observó el cambio en el arreglo de las fibras de actina posterior a la interacción de los queratinocitos con las tres diferentes cepas de actinomicetos. *N. brasiliensis*, *A. madurae* y *Actinomadura Gea* (todas teñidas en color verde). La imagen 1 corresponde a la infección con la cepa *N. brasiliensis* ATCC, en la imagen 2 se muestran a los queratinocitos infectados con la cepa *A. madurae* ATCC 19425, mientras que la cepa proveniente del aislado clínico, la cepa *A. madurae* Gea está en la imagen 3. En todas las imágenes se muestran los núcleos de los queratinocitos en color azul, las fibras del citoesqueleto en color rojo y las bacterias en color verde.

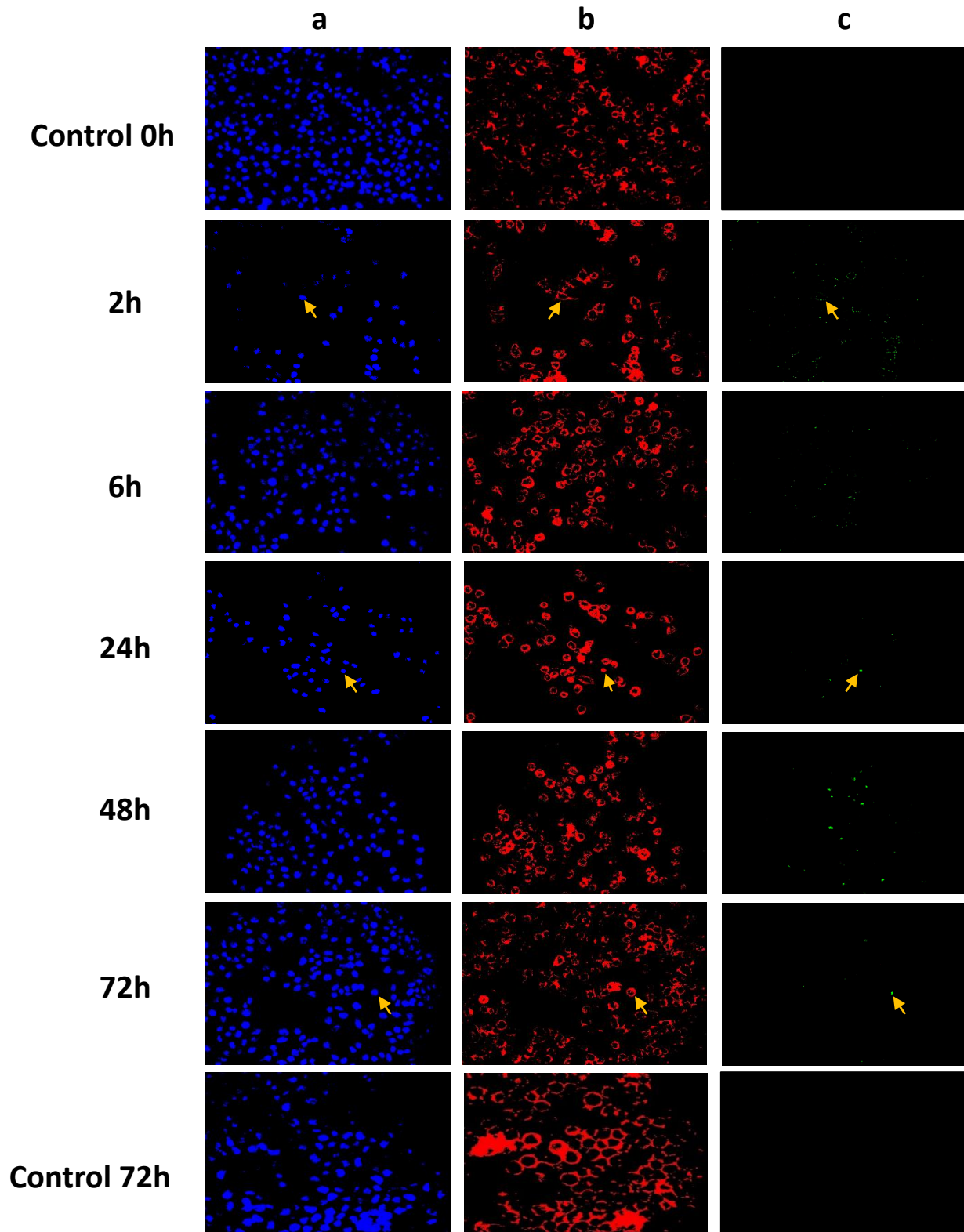
N. brasiliensis 19296



A. madurae 19425



A. madurae Gea



Las imágenes obtenidas por epifluorescencia muestran que las fibras de actina del citoesqueleto sufren un rearrreglo conforme transcurren las horas de infección, esto se puede observar en el cambio en la morfología clásica de los queratinocitos (forma ovoide), a una forma más esférica y mucho más teñida de color rojo en la parte central y en los bordes de la célula.

El cambio morfológico en los queratinocitos se puede apreciar a partir de las 2h post infección para las cepas de *N. brasiliensis* ATTC19296 (Fig. 1) y *A. madurae* ATTC 19425 (Fig. 2), mientras que el aislado clínico *A. madurae* Gea (Fig. 3) muestra este mismo cambio pasadas 6h post infección, dicho cambio permanece constante en las siguientes horas, sin embargo para la cepa de *N. brasiliensis* ATTC 19296 (Fig. 1) se nota una morfología igual a la observada a la hora 0 y a los controles sin infectar a 72h de la cinética.

En las imágenes también se distingue como las tres cepas de actinomicetos flanquean el contorno celular y algunas otras se encuentran dentro de los queratinocitos, esto superponiendo las imágenes (Fig. 1, 2, 3 c).

Visualizamos también que los núcleos (en color azul) conservan su integridad durante la cinética de infección para cada cepa de actinomiceto (Fig. 1, 2, 3 a), así también permanece la integridad de las monocapas.

6. Discusión

Los queratinocitos al ser la estirpe celular de mayor abundancia en la epidermis y los sensores iniciales para la piel, proporcionan una barrera inmunológica contra los microorganismos patógenos (Wang et al., 2018). Con el paso del tiempo las especies bacterianas han evolucionado para explotar una enorme diversidad de nichos ambientales para su crecimiento y replicación. Uno de estos nichos replicativos más especializados es el interior de una célula eucariota viva (Otten, Brill, Vollmer, Viollier, & Salje, 2018).

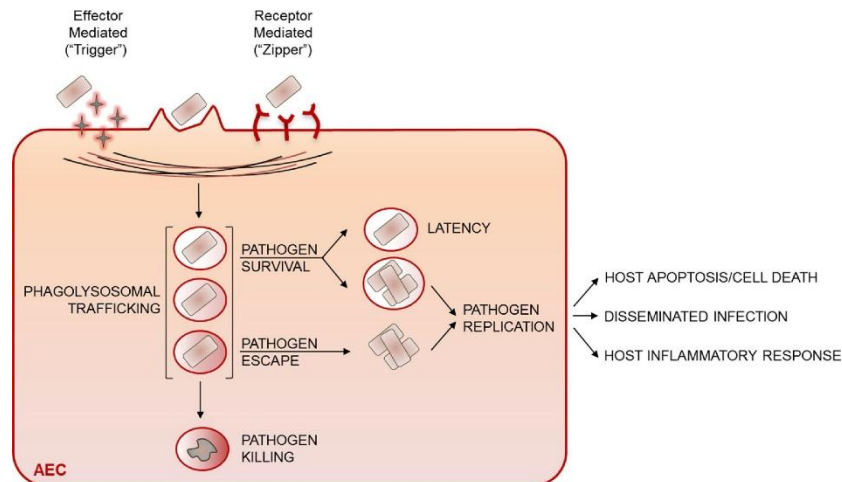
La infección con *N. brasiliensis*, *A. madurae* y *A. madurae* Gea provoca el rearrreglo de las fibras de actina y con ello cambios morfológicos en el citoesqueleto de los queratinocitos, lo cual podemos visualizar en las Fig. 1 y 2 a

partir de las 2 horas post infección, y en la Fig. 3 a partir de las 6 horas post infección, ya que para este momento encontramos bacterias en el citoplasma de los queratinocitos o circundando los bordes celulares de manera bien definida (Fig. 1, 2 y 3 c), dichos eventos son evidentes hasta 72 horas post infección, esto muy probablemente a que las tres cepas son patógenos intracelulares facultativos (Tan et al., 2010) y se valen de diferentes estrategias para poder internalizarse en estas células, evadiendo así la respuesta inmune (Könönen & Wade, 2015) y encontrando un nicho adecuado para crecer y replicarse (Otten et al., 2018). Cabe resaltar que en ningún momento se observa destrucción celular o de los núcleos de los queratinocitos. Por lo que las monocapas de queratinocitos HaCaT se mantienen integras a lo largo de la infección (Fig. 1, 2 y 3 a).

Generalmente las bacterias intracelulares están contenidas dentro de una vacuola, que se fusiona con los lisosomas para ser eliminadas por las enzimas contenidas dentro de estos, pero existen algunas bacterias que pueden evitar la fusión vacuola-lisosoma o convertir dicho compartimiento en un entorno permisivo para su supervivencia (De Souza Santos & Orth, 2015) y al residir latentemente en el nicho intracelular o replicarse, estos patógenos explotan con éxito la internalización por la célula huésped para causar daño y desencadenar respuestas inflamatorias, lo que finalmente conduce a una infección diseminada (Bertuzzi, Hayes, & Bignell, 2019) como es el caso del actinomicetoma.

Podemos inferir también que el rearrreglo de las fibras de actina se debe principalmente a la entrada de los actinomicetos a los queratinocitos, que en este tipo de células (no fagocíticas) se puede llevar a cabo por dos mecanismos uno por medio de ligandos de las superficies bacterianas que se unen a receptores en las células huésped lo que hace que el cuerpo bacteriano esté muy cerca de la membrana plasmática de la célula como podemos ver en la Fig. 1, 2 y 3 c por lo que la activación de los receptores de la célula huésped desencadena vías de señalización que culminan con reordenamientos moderados de las fibras de actina del citoesqueleto en el sitio de entrada bacteriana (De Souza Santos & Orth, 2015), otro posible mecanismo empleado por estos microorganismos, que algunos

patógenos intracelulares facultativos usan, es la expulsión de proteínas efectoras al citoplasma de la célula huésped mismas que interactúan con reguladores de la polimerización de actina, lo que lleva a la formación de proyecciones transitorias de membrana, provocando la adhesión de la bacteria y su posterior internalización (Da Silva et al., 2012; Bertuzzi et al., 2019), esto explicaría porque se notan mayormente teñidas las fibras de actina en las bordes de los



queratinocitos en las Fig. 1, 2 y 3 b.

Fig. 4 Mecanismos de internalización de bacterias intracelulares en células no fagocíticas. La captación de bacterias intracelulares conduce a la activación de las vías de señalización en la célula huésped y a la remodelación del citoesqueleto en el sitio de entrada del patógeno. Una defensa antimicrobiana exitosa resulta en el tráfico del patógeno internalizado, a través de una serie de compartimentos intracelulares que culminan en la muerte mediada por fagolisosomas. Sin embargo, en algunos casos, los patógenos intracelulares evaden la muerte intracelular ya sea prosperando en el ambiente extremadamente hostil del fagolisosoma o evitando la fusión vacuola-lisosoma. Al residir latentemente en el nicho intracelular o replicarse, estos patógenos explotan con éxito la internalización por células endoteliales y causar daño al huésped, desencadenando respuestas inflamatorias, lo que finalmente conduce a una infección diseminada. Imagen tomada y modificada de (Bertuzzi et al., 2019)

Existen además algunas bacterias intracelulares que una vez en el citosol, reclutan actina para moverse intracelularmente y propagarse a las células vecinas (De Souza Santos & Orth, 2015), lo que nos lleva a entender porque visualizamos mayormente teñidas las fibras de actina en el centro de algunas células, como lo vemos en las Fig. 1, 2 y 3 b.

Aunque podemos dilucidar posibles mecanismos de infección dependientes del rearrreglo de actina, no podemos afirmar cuál de ellos se está llevando a cabo, debido a la insipiente información sobre los mecanismos de patogenicidad de los

actinomicetos, pero si podemos afirmar que sea cual sea el mecanismo se valen de las fibras de actina que componen el citoesqueleto para llevar a cabo su internalización en la célula huésped como lo son los queratinocitos.

7. Conclusión

Los queratinocitos al ser la estirpe celular más abundante en la epidermis son las células que tienen el primer contacto con los microorganismos y los resultados demuestran que la infección con *N. brasiliensis*, *A. madurae* y *A. madura* Gea provocan un rearrreglo claramente marcado de las fibras de actina que componen el citoesqueleto de los queratinocitos, hecho que podría ser un punto clave para vislumbrar el mecanismo de patogenicidad de los actinomicetos y el papel de los queratinocitos en el control de esta infección.

8. Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2008). *Inmunología Celular y Molecular* (6.ª ed.). España: Elsevier.
- Abbas, M., Scolding, P. S., Yosif, A. A., Rahman, R. F. E., EL-Amin, M. O., Elbashir, M. K., Fahal, A. H. (2018). The disabling consequences of Mycetoma. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(12), e0007019.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 80(1), 1-43.
- Barygina, V., Becatti, M., Lotti, T., Moretti, S., Taddei, N., & Fiorillo, C. (2019). ROS-challenged keratinocytes as a new model for oxidative stress-mediated skin diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(1), 28-36.
- Bertuzzi, M., Hayes, G. E., & Bignell, E. M. (2019). Microbial uptake by the respiratory epithelium: Outcomes for host and pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(2), 145-161.
- Castañeda-Casimiro, J., Ortega-Roque, J. A., Venegas-Medina, A. M., Aquino-Andrade, A., Serafín-López, J., Parra, S. E., & Estrada, I. (2009). Péptidos antimicrobianos: Péptidos con múltiples funciones. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 18(1), 16-29.

- Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., & Shrivastava, S. (2013). *Diversity and Versatility of Actinomycetes and Its Role in Antibiotic Production*. 3 (8 Suppl 1), S83-S94.
- da Silva, C. V., Cruz, L., Araújo, N. da S., Angeloni, M. B., Fonseca, B. B., Gomes, A. de O., Barbosa, B. de F. (2012). A glance at Listeria and Salmonella cell invasion: Different strategies to promote host actin polymerization. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 302(1), 19-32.
- De Souza Santos, M., & Orth, K. (2015). Subversion of the cytoskeleton by intracellular bacteria: Lessons from Listeria, Salmonella, and Vibrio. *Cellular microbiology*, 17(2), 164-173.
- Dias, K. de C., Barbugli, P. A., de Patto, F., Lordello, V. B., Penteado, L. de A., Medeiros, A. I., & Vergani, C. E. (2017). Soluble factors from biofilm of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* promote cell death and inflammatory response. *BMC Microbiology; London*, 17.
- Emmanuel, P., Dumre, S. P., Stephen, J., Karbwang, J., & Hirayama, K. (2018). Mycetoma: A clinical dilemma in resource limited settings. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials; London*, 17.
- Erdei, L., Bolla, B. S., Bozó, R., Tax, G., Urbán, E., Kemény, L., & Szabó, K. (2018). TNIP1 Regulates *Cutibacterium acnes*-Induced Innate Immune Functions in Epidermal Keratinocytes. *Frontiers in Immunology*, 9, 2155.
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), 485-492.
- García-Pérez, B. E., De la Cruz-López, J. J., Castañeda-Sánchez, J. I., Muñoz-Duarte, A. R., Hernández-Pérez, A. D., Villegas-Castrejón, H., Luna-Herrera, J. (2012). Macropinocytosis is responsible for the uptake of pathogenic and non-pathogenic mycobacteria by B lymphocytes (Raji cells). *BMC Microbiology*, 12, 246.
- García-Pérez, B. E., Villagómez-Palatto, D. A., Castañeda-Sánchez, J. I., Coral-Vázquez, R. M., Ramírez-Sánchez, I., Ordoñez-Razo, R. M., & Luna-Herrera, J. (2011). Innate response of human endothelial cells infected with mycobacteria. *Immunobiology*, 216(8), 925-935.
- Gefen, A., & Weihs, D. (2016). Cytoskeleton and plasma-membrane damage resulting from exposure to sustained deformations: A review of the mechanobiology of chronic wounds. *Medical Engineering & Physics*, 38(9), 828-833.

- Karki, P., Meliton, A., Sitikov, A., Tian, Y., Ohmura, T., & Birukova, A. A. (2019). Microtubule destabilization caused by particulate matter contributes to lung endothelial barrier dysfunction and inflammation. *Cellular Signalling*, 53, 246-255.
- Kim, J.-A., Seong, R.-K., Son, S. W., & Shin, O. S. (2019). Insights into ZIKV-Mediated Innate Immune Responses in Human Dermal Fibroblasts and Epidermal Keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 139(2), 391-399.
- Kindt, T., Goldsby, R., & Osborne, B. (2007). *INMUNOLOGÍA de Kuby* (6.^a ed.). México: McGrawHill.
- Kollau, A., Gesslbauer, B., Russwurm, M., Koesling, D., Gorren, A. C. F., Schrammel, A., & Mayer, B. (2018). Modulation of nitric oxide-stimulated soluble guanylyl cyclase activity by cytoskeleton-associated proteins in vascular smooth muscle. *Biochemical Pharmacology*, 156, 168-176.
- Könönen, E., & Wade, W. G. (2015). Actinomyces and Related Organisms in Human Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 419-442.
- Kroppenstedt, R. M., & Goodfellow, M. (2006). The Family Thermomonosporaceae: Actinocorallia, Actinomadura, Spirillospora and Thermomonospora. En *Prokaryotes* (Vol. 3, pp. 682-724).
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016). Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*.
- López Martínez, R., Méndez Tovar, L. J., Bonifaz, A., Arenas, R., Mayorga, J., Welsh, O., Manzano Gayosso, P. (2013). Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gaceta Médica de México*, 149(5), 586-592.
- López-González, M., Meza-Sánchez, D., García-Cordero, J., Bustos-Arriaga, J., Vélez-Del Valle, C., Marsch-Moreno, M., Cedillo-Barrón, L. (2018). Human keratinocyte cultures (HaCaT) can be infected by DENV, triggering innate immune responses that include IFN λ and LL37. *Immunobiology*, 223(11), 608-617.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14.^a ed.). España: Pearson.
- Marriott, H. M., Hellewell, P. G., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2007). Contrasting roles for reactive oxygen species and nitric oxide in the innate response to pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*, 25(13), 2485-2490.

- Méndez, Luis J. (2014, noviembre). Micetoma. Recuperado de Departamento de Microbiología y Parasitología-Recursos de Micología website:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/micetoma.html>
- Mesa, M., & Patino, P. (2006). Toll like receptors: Between infectious non-self recognition and the endogenous danger signals. *Inmunología*, 25, 115-130.
- Mohamed, H. T., Fahal, A., & Sande, W. W. van de. (2015, junio 5). Mycetoma: Epidemiology, treatment challenges, and progress.
- Morizane, S., Kajita, A., Mizuno, K., Takiguchi, T., & Iwatsuki, K. (2019). Toll-like receptor signalling induces the expression of serum amyloid A in epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Clinical and Experimental Dermatology*, 44(1), 40-46.
- Navarrete, G. (2007). *Histología de la piel*. 130-133.
- Nenoff, P., van de Sande, W. w. j., Fahal, A. h., Reinel, D., & Schöfer, H. (2015). Eumycetoma and actinomycetoma – an update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(10), 1873-1883.
- Otten, C., Brilli, M., Vollmer, W., Viollier, P. H., & Salje, J. (2018). Peptidoglycan in obligate intracellular bacteria. *Molecular Microbiology*, 107(2), 142-163.
- Parham, P. (2011). *El Sistema Inmune* (Tercera). México: El Manual Moderno.
- Pelaseyed, T., & Bretscher, A. (2018). Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 131(20).
- Relhan, V., Mahajan, K., Agarwal, P., & Garg, V. (2017). Mycetoma: An update. *Indian Journal of Dermatology; Kolkata*, 62(4).
- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). [Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases]. *Salud Publica De Mexico*, 48(1), 62-71.
- Rivera, L. E. C., Palma Ramos, A., & Padilla Desgarenes, C. (2007). Péptidos antimicrobianos: Antibióticos naturales de la piel. *Dermatología Revista Mexicana*, 51(2), 57-67.
- Rojas-Espinosa, O. (2006). *Inmunología (de memoria)* (3.^a ed.). México: Médica Panamericana.

- Sánchez-Ramón, S., López-Longo, F. J., & Carreño, L. (2011). Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: Más allá de las citocinas proinflamatorias. *Reumatología Clínica*, 6, 20-24.
- Simanski, M., Erkens, A.-S., Rademacher, F., & Harder, J. (2019). Staphylococcus epidermidis-induced Interleukin-1 Beta and Human Beta-defensin-2 Expression in Human Keratinocytes is Regulated by the Host Molecule A20 (TNFAIP3). *Acta Dermato-Venereologica*, 99(2), 181-187.
- Svitkina, T. M. (2018). Ultrastructure of the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 54, 1-8.
- Tan, C.-K., Lai, C.-C., Lin, S.-H., Liao, C.-H., Chou, C.-H., Hsu, H.-L., Hsueh, P.-R. (2010). Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis including those caused by emerging Nocardia species in Taiwan, 1998–2008. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), 966-972.
- Torres, E., Vásquez del Mercado, E., Moreno, G., & Arenas, R. (2008). Micetomas actinomicéticos. Resultados terapéuticos en 15 casos. *Dermatología Revista Mexicana*, 52(2), 65-69.
- Van de Sande, W. W. J. (2013). Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(11).
- Verma, P., & Jha, A. (2019, marzo 1). Mycetoma: Reviewing a neglected disease.
- Wang, Z., Kong, L., Liu, Y., Fu, Q., Cui, Z., Wang, J., Sun, J. (2018). A Phage Lysin Fused to a Cell-Penetrating Peptide Kills Intracellular Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Keratinocytes and Has Potential as a Treatment for Skin Infections in Mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(12).
- Welsh, O. (2018). Response to newer therapeutic modalities for actinomycetoma by Nocardia species. *International Journal of Dermatology*, 57(9), e65-e66.
- Woon-Hae, K., Hyun-Jin, A., Jung-Yeon, K., Gwon, M.-G., Gu, H., Jeon, M., Park, K.-K. (2018). Anti-Inflammatory Effect of Melittin on Porphyromonas Gingivalis LPS-Stimulated Human Keratinocytes. *Molecules; Basel*, 23(2).

Vo. Bo. De los asesores



Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez



M. en C. Alfonso Santiago Téllez